

International

PATENT COOPERATION TREATY

PCT



REC'D 05 OCT 2005
WIPO PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY
(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference CPS41234		FOR FURTHER ACTION See Form PCT/IPEA/416	
International application No. PCT/CN2004/000458		International filing date (day/month/year) 09.MAY.2004 (09.05.2004)	Priority date (day/month/year) 10.MAY.2003 (10.05.2003)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC IPC7: C12N15/86, C12N15/12, A61K48/00, A61P17/00			
Applicant PENG, Zhaohui et al.			
<p>1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p>3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising:</p> <p>a. <input checked="" type="checkbox"/> (sent to the applicant and to the International Bureau) a total of <u>27</u> sheets, as follows:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions).</p> <p><input type="checkbox"/> sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box.</p> <p>b. <input type="checkbox"/> (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic _____, containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).</p>			
<p>4. This report contains indications relating to the following items:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Box No. I Basis of the report</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. II Priority</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. IV Lack of unity of invention</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. VI Certain documents cited</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. VII Certain defects in the international application</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. VIII Certain observations on the international application</p>			
Date of submission of the demand 14.Sep.2004(14.09.2004)		Date of completion of this report 06.Sep.2005(06.09.2005)	
Name and mailing address of the IPEA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China, 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088		Authorized officer KE,Ke	
Facsimile No. 86-10-62019451		Telephone No. (86-10):62085090	

Form PCT/IPEA/409 (cover sheet) (April 2005)

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement:

Novelty (N)	Claims 4-8	YES
	Claims 1-3,9	NO
Inventive step (IS)	Claims	YES
	Claims 1-9	NO
Industrial applicability (IA)	Claims 1-9	YES
	Claims	NO

2. Citations and explanations (Rule 70.7)

The document as followed is cited by the report:

Document 1(D1):THE JOURNAL OF GENE MEDICINE 2000,2 (6) , 426-432.

Toshiro Shirakawa et al:P53 Adenoviral vector(Ad-CMV-p53) induced prostatic growth inhibition of primary cultures of human prostate and an experimental rat model.

Document 2(D2):CN1401778A 12.03.2003

About novelty:

D1 has disclosed that the recombinant of adenoviral vector and p53 can be used in the treatment of prostatic hyperplasia.Prostatic hyperplasia is a kind of proliferative disease.So the technical solution of claim 1 has been disclosed by D1.Claim 1 don't appear to be novel and don't appear to meet the criteria mentioned in article 33(2)PCT.

Claims 2,3,9 are dependent claims of claim 1.The additional technical features of these claims have been disclosed in D1(such technical features lie in "production of recombinant adenoviruses" and "in vivo experimental design" of "materials and methods" of D1).Thus claims 2,3,9 don't appear to be novel and don't appear to meet the criteria mentioned in article 33(2)PCT.

The technical solutions of claims 4-8 aren't disclosed .Thus,claims 4-8 possess novelty and meet the criteria mentioned in article 33(2)PCT.

About inventiveness:

Claims 4,5 are dependent claims of claim 1.The additional technical features of them are the products defined by the preparation method. Though D1 didn't disclosed the preparation method of the recombinant in detail,D2 disclosed the recombinant which was prepared by the same method as that of claims 4-5(see the claims). There is no substantive difference between the products of D1 and D2.It's easy for the person skilled in the relevant field of technology to realize that such similar products have the same use. So it's obvious for the person skilled in the relevant field of technology to obtain the technical solutions of claims 4-5 through combination of D1 and D2 . Thus,claims 4 and 5 don't appear to be inventive and don't appear to meet the criteria mentioned in article 33(3)PCT.

Claims 6-8 are dependent claims of claim 1.The additional technical features of them are the types of proliferative diseases.Because these proliferative diseases have similar pathogenesis with prostatic hyperplasia,the technical solutions of claims 6-8 are obvious to the person skilled in the relevant field of technology in light of D1.Claims 6-8 don't appear to be inventive and don't appear to meet the criteria mentioned in article 33(3)PCT.

About industrial applicability:

Claims 1-9 can all be used in treatment of diseases and possess industrial applicability.They all meet the criteria mentioned in article 33(4)PCT.

Box No. I Basis of the report**1. With regard to the language, this report is based on:**

- ☒ the international application in the language in which it was filed
- ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of:
- ☐ international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
- ☐ publication of the international application (Rule 12.4(a))
- ☐ international preliminary examination (Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))

2. With regard to the elements of the international application, this report is based on (replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report):

- ☐ the international application as originally filed/furnished

☒ the description:

pages _____ as originally filed/furnished

pages * 1-12 received by this Authority on 19.Nov.2004

pages * _____ received by this Authority on _____

☒ the claims:

claims _____ as originally filed/furnished

claims * _____ as amended (together with any statement) under Article 19

claims * 1-9 received by this Authority on 19.Nov.2004

claims * _____ received by this Authority on _____

☒ the drawings:

pages _____ as originally filed/furnished

pages * 1-11 received by this Authority on 19.Nov.2004

pages * _____ received by this Authority on _____

- ☒ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/figs _____
- ☐ the sequence listing (specify): _____
- ☐ any table(s) related to sequence listing (specify): _____

4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/figs _____
- ☐ the sequence listing (specify): _____
- ☐ any table(s) related to sequence listing (specify): _____

* If item 4 applies, some or all of those sheets may be marked "superseded."

Supplemental Box Relating to Sequence Listing

Continuation of Box No. I, item 2:

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this report was established on the basis of:

a. type of material

- ☒ a sequence listing
☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material

- ☐ on paper
☒ in electronic form

c. time of filing/furnishing

- ☐ contained in the international application as filed
☐ filed together with the international application in electronic form
☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search and/or examination
☒ received by this Authority as an amendment * on 19.Nov.2004

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table(s) relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

**If item 4 in Box No.I applies, the listing and/or table(s) related thereto, which form part of the basis of the report, may be marked "superseded."*

专 利 合 作 条 约

PCT

专利性国际初步报告

(PCT 第II章)

(PCT 36 和细则 70)

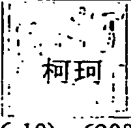
REC'D 05 OCT 2005

WIPO

PCT

申请人或代理人的档案号 CPS41234	关于后续行为 参见 PCT/IPEA/416 表	
国际申请号 PCT/CN2004/000458	国际申请日(日/月/年) 09.5 月 2004 (09.05.2004)	优先权日(日/月/年) 10.05 月 2003 (10.05.2003)
国际专利分类(IPC)或者国家分类和 IPC 两种分类 IPC7: C12N15/86, C12N15/12, A61K48/00, A61P17/00		
申请人 彭朝晖等		

1. 本报告是国际初步审查单位根据条约 35 做出的国际初步审查报告, 并依照条约 36 将其传送给申请人。 2. 本报告共计 4 页, 包括扉页。 3. <input checked="" type="checkbox"/> 本报告还有附件, a. <input checked="" type="checkbox"/> (传送给国际局和申请人)共计 27 页, 包含 <input checked="" type="checkbox"/> 修改后的并且作为本报告基础的说明书修改页、权利要求书修改页和/或附图修改页, 和/或对 本国际初步审查单位所做出的更正页(见 PCT 细则 70.16 和行政规程 607)。 <input type="checkbox"/> 国际初步审查单位认为修改超出原始公开范围的取代页, 参见第 I 栏第 4 项和补充栏。 b. <input type="checkbox"/> (传送给国际局) 共计 (指明电子载体的类型和数量) _____, 包含有在与序列列表有关的补充栏中 指明的电子形式的序列列表和/或与其相关的表格。(行政规程 802)
4. 本报告包括关于下列各项的内容: I <input checked="" type="checkbox"/> 报告的基础 II <input type="checkbox"/> 优先权 III <input type="checkbox"/> 不做出关于新颖性、创造性和工业实用性的意见 IV <input type="checkbox"/> 缺乏发明的单一性 V <input checked="" type="checkbox"/> 按条约 35(2)关于新颖性、创造性或工业实用性的理由; 支持这种意见的引证和解释 VI <input type="checkbox"/> 引用的某些文件 VII <input type="checkbox"/> 国际申请中的某些缺陷 VIII <input type="checkbox"/> 对国际申请的某些意见

提交要求书的日期 14.9 月 2004 (14.9.2004)	完成本报告的日期 06.09 月 2005 (06.09.2005)
中华人民共和国国家知识产权局 IPEA/CN 中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)	授权官员  柯珂
传真号: (86-10) 62019451	电话号码 (86-10): 62085090

1. 报告的基础

1. 关于语言, 本报告将基于:

☒ 申请提出时使用的语言。

☐ 该申请的____语言译文, 提供该种语言的译文是

☐ 为了国际检索而提交的译文所使用的语言(细则 12.3 和 23.1 (b))。

☐ 为了国际申请的公布而提交的译文所使用的语言(细则 12.4)。

☐ 为了国际初步审查而提交的译文所使用的语言(细则55.2和/或55.3)。

2. 关于国际申请中各个部分, 本报告基于(申请人为答复受理局根据条约 14 所发通知而提交的替换页, 在本报告中视为“原始提交”的文件, 不作为本报告的附件)

☐ 原始提交的国际申请。

☒ 说明书, 第____页 原始提交的,
第 1-12 页 2004 年 11 月 19 日 初审单位收到的,
第____页 初审单位收到的。

☒ 权利要求, 第____项, 原始提交的,
第____项, 按条约 19 条修改的(附有说明);
第 1-9 项 2004 年 11 月 19 日 初审单位收到的,
第____项 初审单位收到的。

☒ 附图, 第____页, 原始提交的。
第 1-11 页*, 2004 年 11 月 19 日 初审单位收到的,
第____页*, 初审单位收到的。

☒ 序列表和/或相关表格——参见与序列表有关的补充栏。

3. 修改导致以下内容的删除:

☐ 说明书, 第____页

☐ 权利要求, 第____项

☐ 附图, 第____页, 图____

☐ 序列表(具体说明)____

☐ 与序列表相关的表格(具体说明)____

4. ☐ 由于本报告附件的(某些)修改, 如下所列, 被认为超出了原始公开的范围, 如补充栏所示, 因此本报告是按照没有修改的情况做出的(细则 70.2(c))。

☐ 说明书, 第____页

☐ 权利要求, 第____项

☐ 附图, 第____页, 图____

☐ 序列表(具体说明)____

☐ 与序列表相关的表格(具体说明)____

*如果第 4 项适用, 一些或全部的文件页可能做出“被取代”标记。

V. 按条约 35 (2) 关于新颖性、创造性或工业实用性的意见：支持这种理由的引证和解释

1. 意见

新颖性(N)	权利要求 4-8	是
	权利要求 1-3,9	否
创造性(IS)	权利要求	是
	权利要求 1-9	否
工业实用性(LA)	权利要求 1-9	是
	权利要求	否

2. 引证和解释 (细则 70.7)

本书面意见引证了下列对比文件：

对比文件 1: THE JOURNAL OF GENE MEDICINE, 2000, 2 (6), 426-432,

Toshiro Shirakawa et al:P53 Adenoviral vector(Ad-CMV-p53) induced prostatic growth inhibition of primary cultures of human prostate and an experimental rat model.

对比文件 2: CN1401778A 2003 年 3 月 12 日

关于新颖性：

权利要求 1 请求保护腺病毒载体与 P53 人肿瘤抑制基因表达盒构建而成的重组体在制备治疗增生性疾病的药物中的应用。对比文件 1 已经公开了腺病毒载体与 P53 基因的重组体可用于治疗前列腺增生，前列腺增生是一种增生性疾病，因此，权利要求 1 没有新颖性，不符合专利合作条约第 33 条 (2) 的规定。

权利要求 2, 3, 9 是权利要求 1 的从属权利要求，限定的附加技术特征在对比文件 1 中已经公开（见对比文件 1 “materials and methods”中的 “production of recombinant adenoviruses”和 “in vivo experimental design”），因此，权利要求 2, 3, 9 没有新颖性，不符合专利合作条约第 33 条 (2) 的规定。

权利要求 4-8 的技术方案没有公开，因此，权利要求 4-8 有新颖性，符合专利合作条约第 33 条 (2) 的规定。

关于创造性：

权利要求 4, 5 是权利要求 1 的从属权利要求，其附加技术特征是用制备方法对重组体做了限定，虽然对比文件 1 没有公开重组体的具体生产方法，但是对比文件 2 公开了用与权利要求 4, 5 同样的方法生产的产品（见对比文件 2 权利要求），对比文件 1 和对比文件 2 的产品没有本质区别，本领域普通技术人员很容易想到这样的相似产品有相同的用途，因此，本领域普通技术人员将对比文件 1 和 2 结合得出权利要求 4, 5 的技术方案是显而易见的，权利要求 4, 5 没有创造性，不符合专利合作条约第 33 条 (3) 的规定。

权利要求 6-8 是权利要求 1 的从属权利要求，分别限定了增生性疾病的种类是瘢痕，病理性瘢痕，瘢痕疙瘩，由于这些病症都是增生性疾病，与对比文件 1 公开的增生性疾病前列腺增生的机理相似，因此，本领域普通技术人员从对比文件 1 得出启示将所述重组体应用于这些增生性疾病是显而易见的。权利要求 6-8 没有创造性，不符合专利合作条约第 33 条 (3) 的规定。

关于工业实用性：

权利要求 1-9 都可应用于疾病的治疗，具有工业实用性，符合专利合作条约第 33 条 (4) 的规定。

关于序列表的补充栏

续第 I 栏第 2 项:

1 关于本国际申请中所公开的对所要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸的序列表, 本国际初步审查的建立是根据:

a. 文件的类型

☒ 序列表

☐ 与序列表相关的表格

b. 文件的形式

☐ 纸件形式

☒ 电子形式

c. 提交的时间

☐ 包含在国际申请中

☐ 以电子形式与国际申请同时提交

☐ 为了检索和/或审查的目的提交给初审单位的

☒ 以修改*的形式由初审单位在 2004 年 11 月 19 日 收到

2. 另外, 在提交了不少于一个版本或副本的序列表和/或与序列表相关的表格情况下, 已经提交了关于后续或附加版本与原始提交的文件相同或没有超出原始提交文件范围的声明。

3. 其它意见:

*如果第一栏第 4 项适用, 形成报告基础的序列表和/或相关表格可能做出“废除”标记。

治疗增生性疾病的腺病毒载体与 p53 基因的基因重组药物

技术领域

本发明涉及腺病毒载体与 p53 基因的基因重组药物, 更具体地说是涉及腺病毒载体与 p53 基因的基因重组药物在制备治疗增生性疾病的药物中的用途。

背景技术

增生性疾病是以细胞增生和/或代谢产物异常表达为特征的一种基因病, 是广泛发生于人体各组织器官(如皮肤、骨髓、乳腺等)并产生不同程度功能障碍的一种良性增生。瘢痕是人类创伤修复过程中必然的产物和最终结果, 任何创伤的愈合都会由不同程度的瘢痕形成。瘢痕分为正常瘢痕和病理性瘢痕。病理性瘢痕包括增生性瘢痕和瘢痕疙瘩, 均表现为瘤样增生及功能障碍, 是人类医学四大难题之一。瘢痕疙瘩是一种皮肤增生性疾病, 指人体某处皮肤损伤后引发或自发产生的胶原异常积聚所致的过度瘢痕化。它们临床表现为过度生长, 超过原伤口界限, 侵犯临近组织, 自始至终不退化且单纯手术切除后易复发等特点。有众多的实验证实, 瘢痕疙瘩存在 p53 基因的突变, 目前仍然缺乏治疗瘢痕疙瘩的明确且有效的方案, 它是整形外科面临的一个最重要的难题之一。

目前用于防治增生性疾病的药物主要有(1)皮质激素类, 其对小面积病理性瘢痕治疗有效, 但是局部皮肤萎缩、色素减退或脱色、毛细血管扩张、乃至皮肤坏死、溃疡形成等, 严重时会引起全身反应如高血压, 骨质疏松, 消化性溃疡穿孔或诱发畸胎, 甚至出现库欣综合征; (2)维甲酸类药物, 在瘢痕治疗中并不常用; (3)曲尼司特(tranilast)(肉桂氨回酸), 服用半年以上才有显效。也可以使用手术治疗、激光治疗、放射治疗、压迫疗法等。

近年来随着病理性瘢痕相关基因研究的进展,一些参与调控成纤维细胞增殖-凋亡及胶原代谢的基因被相继克隆及其功能被明确阐述,发展出针对增生性疾病的基因治疗方法。

本申请人在中国发明公开 CN 1401778A 中公开了一种能在基因工程改造过的特定细胞中扩增、繁殖,也能在真核细胞中表达肿瘤抑制蛋白的融合序列。该重组体的载体可以为 DNA 病毒或 RNA 病毒的任一种,其优选载体为腺病毒载体或含有腺病毒载体序列的复合载体,最优选载体为腺病毒载体。

其中人肿瘤抑制基因可以是具有对肿瘤抑制作用的基因中的任一种,其最优选基因为 p53 基因。

该重组体由腺病毒载体与 p53 基因构建而成,定义为重组 p53 腺病毒体,其融合序列为:

腺病毒 5 基因组序列右侧-ATGTTTACCGCCACACTCGCAGGGTCTGCACCTGGTGCGGG
TCTCATCGTACCTCAGCACCTTCCAGATC₇₀TCTGACATGCGATGTCGACTCGACTGCTTCGCGA
TGTACGGGCCAGATATACGCGTATCTGAGGGGACTAGGGTGTGTTTAGGCGAAAAGCGGGGCTT
CGGTTGTACGCGTTAGGAGTCCCCTCAGGATATAGTAGTTTTCGCTTTTGCATAGGGAGGGGA
AATGTAGTCTTATGCAATACTCTTGTAGTCTTGCAACATGGTAACGATGAGTTAGCAACATGCC
TTACAAGGAGAGAAAAAGCACCGTGCATGCCGATTGGTGGAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCT
TATTAGGAAGGCAACAGACGGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAATTCGCGATTGCAGA
GATATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCGATACAATAAACGCCATTTGACCATTACACACATTGGTG
TGCACCTCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCCG₅₂₃CTAGAGCCACCGTCCAGGGAGCAGGTAG
CTGCTGGGCTCCGGGGACACTTTGCGTTCGGGCTGGGAGCGTCTTTCCACGACGGTGACACGCT
TCCCTGGATTGGCAGCCAGACTGCTTTCCGGGTCACTGCC₆₅₅ATGGAGGAGCCGCAGTCAGATCC
TAGCGTCGAGCCCCCTCTGAGTCAGGAAACATTTTCAGACCTATGGAACTACTTCCTGAAAAC
AACGTTCTGTCCCCCTTGCCGTCCCAAGCAATGGATGATTTGATGCTGTCCCCGACGATATTG
AACAAATGGTTCACTGAAGACCCAGGTCCAGATGAAGCTCCAGAAATGCCAGAGGCTGCTCCCC
CGTGGCCCCCTGCACCAGCAGCTCCTACACGGGCGGCCCTGCACCAGCCCCCTCCTGGCCCCCTG
TCATCTTCTGTCCCTTCCCAGAAAACCTACCAGGGCAGCTACGGTTTCCGTCTGGGCTTCTTGC

ATTCTGGGACAGCCAAGTCTGTGACTTGCACGTACTCCCCTGCCCTCAACAAGATGTTTTGCCA
 ACTGGCCAAGACCTGCCCTGTGCAGCTGTGGGTTGATTCCACACCCCCGCCCCGCACCCGCGTC
 CGCGCCATGGCCATCTACAAGCAGTCACAGCACATGACGGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACC
 ATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAGGAAA
 TTTGCGTGTGGAGTATTTGGATGACAGAAACACTTTTCGACATAGTGTGGTGGTCCCCTATGAG
 CCGCCTGAGGTGGCTCTGACTGTACCACCATCCACTACAACACTACATGTGTAACAGTTCCTGCA
 TGGGCGGCATGAACCGGAGGCCCATCCTCACCATCATCACACTGGAAGACTCCAGTGGTAATCT
 ACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTTTGTGCCTGTCCTGGGAGAGACCGGGCCACAGAG
 GAAGAGAATCTCCGCAAGAAAGGGGAGCCTCACCACGAGCTGCCCCAGGGAGCACTAAGCGAG
 CACTGCCCCAACAACACCAGCTCCTCTCCCCAGCCAAAGAAGAAACCACTGGATGGAGAATATTT
 CACCCTTCAGATCCGTGGGCGTGAGCGCTTCGAGATGTTCCGAGAGCTGAATGAGGCCTTGGA
 CTCAAGGATGCCAGGCTGGGAAGGAGCCAGGGGGGAGCAGGGCTCACTCCAGCCACCTGAAGT
 CCAAAAAGGGTCAGTCTACCTCCCGCCATAAAAACTCATGTTCAAGACAGAAGGGCCTGACTC
 AGACTGA₁₈₃₇CATTCTCCACTTCTTGTTCCCCACTGACAGCCTCCCACCCCCATCTCTCCCTCCC
 CTGCCATTTTGGGTTTTTGGGTCTTTGAACCCTTGCTTGCAATAGGTGTGCGTCAGAAGCACCCA
 GGACTTCCATTTGCTTTGTCCCGGGGCTCCACTGAACAAGTTGGCCTGCACTGGTGTTTTGTTG
 TGGGGAGGAGGATGGGGAGTAGGACATACCAGCTTAGATTTTAAGGTTTTTACTGTGAGGGATG
 TTTGGGAGATGTAAGAAATGTTCTTGCAAGTTAAGGGTAGTTTACAATCAGCCACATTCTAGGT
 AGGGGCCACTTCACCGTACTAACCAGGGAAGCTGTCCCTCACTGTTGAATTTTCTCTAATTCA
 AGGGCCATATCTGTGAAATGCTGGATTTGCCCTACCTCGGAATGCTGGCATTGTCACCTACCTC
 ACAGAGTGCATTGTGAGGGT₂₂₉₇AATGAAATAATGTACATCTGGCCTTGAAACCACCTTTTATT
 ACATGGGGTCTAGCGGGATCCACTAGTAACGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCTGCAGATATCCAT
 CACACTGGCGGGCGCTCGAGCATGCATCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAG
 TTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCC
 ACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTC
 TGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGG
 GGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCGAGGGGGATCCCC
 ACGCTAGAGCT₂₇₃₃GACTATAATAAAACGCCAACTTTGACCCGGAACGCGGAAAACACCTGA

GAAAAACACCTGGGCGAGTCTCCACGTAAACGGTCAAAGTCCCCGCGGCCCTAGACAAATATTA

2848-腺病毒 5 基因组序列左侧

其中:

1. 腺病毒 5 基因组序列右侧和腺病毒 5 基因组序列左侧: 见腺病毒 5 基因组全序列 (Genbank No: NC-001406)
2. 1-70: 腺病毒右侧臂 (70 位碱基位于腺病毒 5 基因组序列正向 3328 位)
3. 71-523: Rous 肉瘤病毒的 LTR (启动子)
4. 524-655: 5' 端非翻译区
5. 656-1837: p53 基因的编码序列
6. 1838-2733: 3' 端非翻译区 (其中从 2298 开始为多聚腺苷酸尾 poly A)
7. 2734-2848: 腺病毒左侧臂 (2734 位碱基位于腺病毒 5 基因组序列正向 452 位碱基)

该重组体的基因表达盒是由启动子—p53cDNA—多聚腺嘌呤核苷酸构成的特征序列, 其上游为任一真核细胞启动子、原核细胞启动子或病毒启动子, 下游为任何真核基因的多聚腺嘌呤核苷酸。

这种重组体是通过如下方法获得的, 重组病毒载体是在原核细胞中同源重组获得的, 首先是腺病毒与质粒 pGT-1 (含有腺病毒两侧反向重复序列) 在大肠杆菌中同源重组获得重组体 pGT-2, 再与人工构建的“腺病毒右侧臂/启动子—p53cDNA—多聚腺嘌呤核苷酸/腺病毒左侧臂” 在大肠杆菌中同源重组获得重组体 pGT-3, 随后经内切酶 *PacI* 线性化去除原核质粒序列, 获得重组 p53 腺病毒体。

根据上述方案, 将 PCR 扩增腺病毒 5 两侧的 LTR 序列, 分别引入 *PacI* 酶切位点。将两侧的 LTR 序列均克隆到 pUC18 载体中, 构成重组载体 pGT-1; 将构建的 pGT-1 载体与腺病毒 5 基因组共转染大肠杆菌株 BJ5183 (赛百诺公司保存, 保存号: P-e012), 使腺病毒 5 基因组与 pGT-1 发生同源重组, 阳性病毒克隆经扩增、PCR 筛选和酶切鉴定, 获得含有腺病毒 5 全基因组的重组载体 pGT-2。

以 5' ATGGAGGAGCCGCAGTCAGATC 和 5' ATATCTGCAGAATTCCAGCAC 作为引

物,通过 PCR 扩增人类肿瘤抑制因子 p53 基因,将扩增的全长 p53 基因(含有 5'和 3'端非翻译区序列)克隆到原核质粒 pUC19,进行测序验证。随后,PCR 分别扩增 RSV (roux sarcoma virus) 的 LTR 序列(含启动子)、BGH 的 PA 序列和腺病毒 E1 区序列,并于一侧分别引入 linker 序列,测序验证。再次进行 PCR 反应时,将 LTR 和 PA 序列分别拼接紧靠 p53 基因的 5'和 3'端。将腺病毒 E1 区及其上游序列分别拼接紧靠 p53 基因的最外侧,构成 p53 复合基因(见图 1)。

将构建好的重组载体 pGT-2 和 p53 复合基因共转染大肠杆菌株 BJ5183,使二者发生同源重组。同上,阳性克隆经扩增、PCR 筛选和酶切鉴定。获得重组载体 pGT-3,该载体中含有腺病毒 5 大部分序列(其 E1 区及上游部分序列被 p53 基因表达盒置换)。重组载体 pGT-3 经 PacI 酶切线性化,去除来源于 pUC18 的载体序列,转染 293 细胞(赛百诺公司冻存,保存号: E-393)培养。在细胞内包装成含有腺病毒顺式活化序列(cis-acting sequence)与 LTR 的启动子操纵的人肿瘤抑制基因 p53。组建成转染效率高、可操作性强、由单启动子控制的重组 p53 腺病毒体。

该重组 p53 腺病毒体具有下列特点:

它是由腺病毒载体和 p53 基因人工表达盒两部分构成,

1、结构特点:其本质是一个活的重组腺病毒体,不同于现有的化学合成药物、中药、基因工程药物,是直接实现目的基因的体内表达,生物学活性高,可有效达到治疗作用;腺病毒载体能携带较大的基因、转染率高、可制备高效价的病毒颗粒,宿主范围广,安全性好,致病性低,尤其是经改建后的腺病毒载体免疫原性大大下降,使目的基因易于在机体内稳定、持久表达;p53 基因人工表达盒是用腺病毒载体单启动子直接调控 p53 基因的表达,且有完整的多聚腺苷酸加尾信号,从而构成一个完整的表达盒(expression cassette),可调控 p53 基因在靶细胞中高效表达。

2、应用特点:该重组 p53 腺病毒体为广谱抗癌药,具有对各种恶性肿瘤的治疗作用。II 期临床实验显示,该重组 p53 腺病毒体对头颈部鳞癌、肺癌等十多种肿瘤具有明显的治疗作用;该重组 p53 腺病毒体具有预防肿

瘤发生的独特作用。I 期临床试验及术后 3 年随访表明, 该重组 p53 腺病毒体可预防喉癌等肿瘤病人的术后复发, 起到肿瘤疫苗的作用。

利用本发明的重组 p53 腺病毒体可制备治疗各种恶性肿瘤的药物, 并可制备预防肿瘤的发生和手术切除后的肿瘤再生的药物。

本申请人在实验中又发现这种重组 p53 腺病毒体制成的药物可以有效抑制异常细胞的增殖, 达到治疗如瘢痕疙瘩等增生性疾病的目的。

发明内容

本发明旨在将具有潜在治疗作用的基因与可转移基因的载体进行有机结合, 而提供一种治疗增生性疾病的腺病毒载体与 p53 基因的基因重组药物, 以诱导增生性疾病异常增生细胞表达功能正常的 P53 蛋白, 从而有效抑制异常细胞的增殖, 达到治疗如瘢痕疙瘩等增生性疾病的目的。

本发明将该基因重组药物先转染到基因工程改造过的特定细胞中培养、繁殖, 浓缩纯化成可用于临床的治疗增生性疾病的腺病毒载体与 p53 基因的基因重组药物注射液。

其中本发明实验所用的 293 细胞系 (ATCC CRL-1573, 第 32 代次, 1997 年 6 月 13 日从 ATCC 订购) 来源于经 5 型腺病毒 (Ad5) DNA 转化人胚胎肾上皮细胞获得, 含有 Ad5 5' 端的 11% 的基因组 (包括 E1a)。该细胞对腺病毒的感染和生长是高度许可的。

本发明的贡献在于, 它利用人类肿瘤抑制基因 p53 能抑制多种异常增生细胞生长的特点, 将其克隆到腺病毒 B1⁻ 株, 通过局部注射, 使腺病毒有效地将 p53 基因导入增生组织, 表达出 P53 蛋白后, 抑制异常增生细胞的生长, 使异常增生细胞出现生长阻滞或凋亡, 从而达到抑制增生性疾病的目。该发明同时也解决了由于 P53 蛋白半衰期短 (约 20 分钟)、不稳定、无法体外制备成为重组基因工程产品的问题, 即实现了 p53 基因的肿瘤和增生性疾病的治。

该基因重组药物利用腺病毒携带人类肿瘤抑制基因 p53, 直接在异常增生细胞中表达, 从而解决了由于 P53 蛋白不稳定、无法用基因工程的方法

体外制备成重组基因工程产品的问题。用腺病毒进行增生性疾病治疗，病人可在体内持续、高效表达 P53 蛋白，并在蛋白质分子修饰程序上，如蛋白质磷酸化、蛋白质折叠以及多聚化等方面都具有与体内真核生物相同的特性。本发明的基因重组药物可直接介导 p53 基因在真核细胞中表达，也就是说可以直接导入增生局部让其表达，使受治疗者自身变成一个可生产人类肿瘤抑制因子 P53 蛋白的“源泉”。这种方法实现将外源 p53 基因的体内转移并在病人增生组织内高效表达而达到治疗目的，使得增生性疾病的基因治疗成为现实。

附图说明

图 1 是本发明的基因重组药物的构建过程示意图。

图 2 是本发明的基因重组药物的技术路线框图。

图 3 是基因重组药物经多次传代后，以 5'CCACGACGGTGACA CGCTTC 和 5' CAAGCAAGGGTTCAAAGAC 为引物，以 p53cDNA 为模版，通过 PCR 扩增得到的 p53 基因的琼脂糖凝胶电泳图，以鉴定其稳定性。PCR 扩增 p53 基因得到的 1400bp 的 DNA 片断。1，DNA 分子量 markers；2、3、4，p53 cDNA 的 PCR 结果。

图 4 是基因重组药物（赛百诺公司冻存，保存号：No-1，下同）感染 293 细胞后 36 小时，经细胞裂解、提取病毒 DNA 经 PCR 鉴定的琼脂糖凝胶分析结果，DNA 片断大小约 2750bp。1，DNA 分子量 markers；2，表达装置的 PCR 结果。

图 5 是基因重组药物感染 Hep-2 和 H1299 细胞后 36 小时，经细胞裂解、提取后经 Western blot 分析结果。重组 p53 腺病毒体介导的 p53 基因在 Hep-2 和 H1299 细胞的表达。1. 蛋白质标准分子量；2-3. 阴性对照：分别为未经 SBN-1 感染的 Hep-2 和 H1299 细胞；4-5: 分别为 SBN-1 感染的 Hep-2 和 H1299 细胞。

图 6 是体外原代培养的瘢痕成纤维细胞。可见传代成纤维细胞排列较整齐，呈结节状或漩涡状走行。光镜下成纤维细胞呈梭形或不规则形，细

胞界线清楚。

图 7 是用 S-P 染色及真空负压法进行成纤维细胞的鉴定。用 S-P 染色及真空负压法显示扁平的梭形细胞的胞浆呈棕色，胞核被复染成兰色，传代细胞全部为阳性细胞，说明它们能够生成 III 型原胶原蛋白，培养的细胞确实为成纤维细胞。

图 8 是基因重组药物对瘢痕成纤维细胞的体外杀伤效应的光学照片。B、C、D 依次记录了瘢痕成纤维细胞经基因重组药物 (MOI=200) 感染后 24h、48h 和 72h 的细胞形态。可见细胞逐渐出现体积明显变大，形态由梭形变成圆形或多边形；胞浆增多；核分裂象减少，核离散、崩解等变化，而对照组 A 中细胞形态无明显变化。

图 9 是基因重组药物对瘢痕成纤维细胞的体外杀伤效应的电镜照片。用透射电镜观察结果显示，经基因重组药物 (MOI=200) 条件下，图 A、B、C 直观描述了细胞从“起泡”到产生凋亡小体并脱落的过程；图 D 可见凋亡细胞的另一种现象，细胞内线粒体明显增多。

图 10 是该基因重组药物对临床瘢痕疙瘩病人治疗作用的术前、术后对比照片。经基因重组药物治疗 4 周后，前胸部瘢痕明显萎缩，体积明显缩小，局部组织发暗。

具体实施方式

下列实施例是对本发明的进一步解释和说明，对本发明不构成任何限制。

实施例 1

如图 1 和图 2 所示，构建基因重组药物及鉴定

1、已发表的 p53 基因 cDNA 全序列，设计合成两段引物：

5' ATGGAGGAGCCGAGTCAGATC 和 5' ATATCTGCAGAATTCCAGCAC 作为引物，两端分别引入 linker 序列。以 HeLa 细胞 cDNA 为模板，经 PCR 方法扩增得到人 p53 基因，其中，反应条件为：第一循环：94℃变性 4 分钟，58℃退火 1 分钟，72℃延伸 2 分钟；以后各循环：94℃变性 1 分钟，58℃退火 1

分钟, 72℃延伸 2 分钟, 共 30 个循环。由此得到大量的 p53 基因, 用琼脂糖凝胶电泳分析, 回收得到 p53 基因全长, 片段纯化后再用此酶切割 p53 基因, 插入到同样酶切的 pUC19 载体中测序, 测得编码区的碱基序列和推导的氨基酸序列 (与 GenBank Acc XM_058834 一致), 随后酶切回收。

2、PCR 反应扩增 LTR 和 PA 序列, 引物分别为:

5'TCTGACATGCGATGTCGACTCG, 5' CGGCAGTGACCCGAAAGCAG; 5' TCACAGAGTGCA TTGTGAGGG, 5' GCTCTAGCGTGGGGATCCC。分别于 5'引物和 3'端引物引入 linker 序列。同上的退火条件下, PCR 扩增 LTR 和 PA 序列, 纯化后克隆测序验证。

3、PCR 反应分开扩增腺病毒的 E1 序列, 反应条件同上, 两端引物分别引入 Bam HI 和 Eco RI 酶切位点, 扩增后测序验证。

4、将 1 所得序列分别与 2 所得的两条序列进行 PCR 反应, 反应条件同前, 得到 PCR 拼接产物 LTR-p53-PA, 进一步测序验证。

5、将 3 所得序列与 4 所得序列 LTR-p53-PA 经 T4 DNA 粘接酶粘接, 获得 p53 复合基因。

6、PCR 反应分别扩增腺病毒两端 IRT 序列, 反应条件同上, 测序验证后分别将两段序列克隆到 pUC18 载体中构成重组载体 pGT-1。

7、提取野生型腺病毒 5 (ATCC-VR-5, 腺病毒株 75, 滴度: 10 (6.75) TCID (50) /ml) DNA, 与重组载体 pGT-1 共转染大肠杆菌 BJ5183, 经 4℃孵育 30 分钟, 42℃热休克 50 秒钟, 再在 4℃孵育 1 分钟, 加 1ml LB 培养液 1 小时, 将温育的工程菌转入含安卡青霉素的琼脂培养板, 24 小时后, 用灭菌牙签挑取单个细菌克隆, 然后放入干净的含有 LB 的培养瓶中, 24 小时后, 按常规方法提取质粒, 用 *PacI* 切割筛选, 获得阳性克隆为 pGT-2 (含有 Ad5 全序列)。

8、将 p53 复合基因与重组载体 pGT-2 共转染大肠杆菌 BJ5183, 同上方法培养, 筛选和鉴定, 获得阳性克隆 pGT-3, 含有腺病毒全基因组序列及插入的 p53 基因表达盒, 再用 *PacI* 酶切, 使之线性化, 去除来源于 pUC18 的载体序列。

9、将分离的阳性质粒线性化后经 CsCl₂ 纯化, 经 CaCl₂ 方法转染 293 细

胞。7 天后, 收集细胞, 1000rpm 离心 15 分钟, 弃上清, 细胞经 37℃-80℃冻融, 裂解三次, 4000rpm 离心 30 分钟, 取上清, 弃沉淀, 上清经二次感染, 扩增病毒, 以同样方法裂解病毒, 上清经 CsCl₂ 密度梯度离心, 条件为: 4℃ 60000 rpm, 16 小时。经 7 号注射针头取重组腺病毒体分离带。用 Spectra MW6000 透析袋在 NIH 缓冲液中透析 4 小时, 整个过程保持 4℃。取出病毒液, 用 0.25 μm 的滤膜过滤除菌, 分装。于 -80℃ 保存, 一部分作空斑形成试验及病毒颗粒含量测定。

10、基因重组药物的结构稳定性鉴定, 经多次传代后, 提取其基因组 DNA, 以 p53 基因两端 5'CCACGACGGTGACACGCTTC 和 5' CAAGCAAGGGT TCAAAGAC 为引物, 进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳结果见图 3; 以基因重组药物表达装置两侧的腺病毒臂 5' TTT CTC AGG TGT TTT CCG C 和 5' CAT CGT ACC TCA GCA CCT TC 为引物, PCR 鉴定结果见图 4。以上结果均表明基因重组药物经多次传代后结构稳定。

11、基因重组药物介导的 p53 基因在 Hep-2 和 H1299 细胞的表达鉴定。用重组 p53 腺病毒体感染 293 细胞 36 小时后, 常规方法裂解细胞, 以 P53 蛋白特异性抗体进行 western blot 分析, 结果见图 5。

实施例 2

基因重组药物对体外原代培养的成纤维细胞杀伤作用:

瘢痕成纤维细胞的体外培养 (见图 6): 将手术切除下的瘢痕皮肤, 在无菌条件下剪成 0.5-1cm³ 小块, 立即投入含 1000U/ml 青、链霉素的培养液中。先将组织用 PBS (含青霉素、链霉素) 洗 2 次, 去除脂肪及结缔组织, 再用 D-Hank 液洗数次, 至液体无油滴, 不混浊, 反复剪碎至 1mm³ 的小块, 加数滴血清于组织块上, 然后将皮肤小块按适当间隔放置于培养瓶壁上, 翻转培养瓶, 使有组织块一面向上, 加入含 10%FBS 的 DMEM 培养液 (注意: 勿使组织与培养液接触!), 将有组织块的一面向上, 入 37℃, 5%CO₂ 培养箱中静置培养, 6-8hr 后, 轻轻翻转培养瓶, 3-4 天内勿动, 以后每 3-4 天换液一次, 10 天左右组织块周围长出细胞, 并渐渐形成细胞晕, 一个月左右细胞长满瓶, 形成单层细胞。

采用 S-P 染色及真空负压法进行细胞类型鉴定

样品制备: 用胰酶消化细胞后, 制成 10000 个/ml 的细胞悬液, 将 $18 \times 18\text{mm}$ 的盖玻片放进 55mm 培养皿中, 每张盖片上滴加两滴细胞悬液, 置 CO_2 培养箱中孵育 6-8h, 依次夹出盖玻片, PBS 彻底清洗 3 次, 置纯丙酮中, 室温下固定 15min 后, PBS 清洗 3 次。

用真空负压法进行 S-P 法免疫细胞化学染色 (见图 7): 使盖玻片细胞面向上, 置载玻片上, 每张滴加 $50 \mu\text{l}$ (鼠抗人), 阴性对照组加入等量的 PBS。置真空负压箱中, 抽负压至 66.7KPa, 10min 后取出, PBS 洗 3 次, 各加 $50 \mu\text{l}$ 生物素标记的第二抗体, 置真空负压箱 10min 后取出, PBS 洗 3 次; 各加 $50 \mu\text{l}$ 链霉素亲生物素蛋白-过氧化物酶溶液, 置负压箱 10min 后取出 PBS 洗 3 次; 各加 $10 \mu\text{l}$ DAB 溶液显色, 室温下 10min 后, PBS 洗 3 次, 苏木素复染 1min, 1% 酒精蓝化数秒, 系列酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树脂胶封片, 显微镜下观察。

光镜下细胞形态变化的观察 (见图 8): 在 25cm^2 培养瓶中接种约 5×10^5 瘢痕成纤维细胞, 培养 24h 后, 换液, 加基因重组药物按 200MOI 进行感染, 24h, 48h, 72h 后在光镜下观察细胞形态变化。

电镜下细胞结构的变化 (见图 9): 在 25cm^2 培养瓶中接种约 5×10^5 瘢痕成纤维细胞, 培养 24h 后, 换液, 加基因重组药物按 200MOI 进行感染, 培养 48h。用胰酶消化、收集细胞悬液于事先制备好的琼脂管中, 2000r/min 离心 15min, 使细胞成团。用 2% 戊二醛及 1% 四氧化锇双重固定细胞。将琼脂包埋的细胞团块经脱水、环氧树脂渗透与包埋、超薄切片及染色后, 在透射电镜下观察和照像。

实施例 3

该基因重组药物在基因治疗瘢痕临床研究中瘢痕疙瘩的治疗作用。

如图 10A、图 10B 所示, 女性瘢痕疙瘩患者, 左侧前胸曾因暗疮后瘢痕而手术, 切除后复发瘤样瘢痕, 术后局部复发 3 年, 经激素等常规治疗无效, 前胸瘢痕体积 $2 \times 1 \times 1\text{cm}^3$ (见图 10A)。经基因治疗 4 周后, 前胸部瘢痕明显萎缩, 体积明显缩小, 局部组织发暗 (见图 10B); 除自限性发热外,

未见其它明显的毒副作用。临床试验研究结果表明，基因重组药物治疗瘢痕疙瘩是安全有效的。

权 利 要 求

1. 腺病毒载体与 p53 人肿瘤抑制基因表达盒构建而成的重组体在制备治疗增生性疾病的药物中的应用。

2. 根据权利要求 1 中所述的应用,其特征在於所述的腺病毒载体与 p53 人肿瘤抑制基因表达盒是由启动子—p53cDNA—多聚腺嘌呤核苷酸构成的特征序列。

3. 根据权利要求 2 中所述的应用,其特征在於所述的腺病毒载体与 p53 人肿瘤抑制基因表达盒的上游为任一真核细胞启动子、原核细胞启动子或病毒启动子,下游为任何真核基因的多聚腺嘌呤核苷酸。

4. 根据权利要求 1 中所述的应用,其特征在於所述的重组体是在原核细胞中同源重组获得的,首先是腺病毒与质粒 pGT-1 (含有腺病毒两侧反向重复序列) 在原核细胞中同源重组获得基因重组药物 pGT-2, 再与人工构建的“腺病毒右侧臂/启动子—p53cDNA—多聚腺嘌呤核苷酸/腺病毒左侧臂”在原核细胞中同源重组获得基因重组药物 pGT-3, 随后经内切酶 *PacI* 线性化去除原核质粒序列。

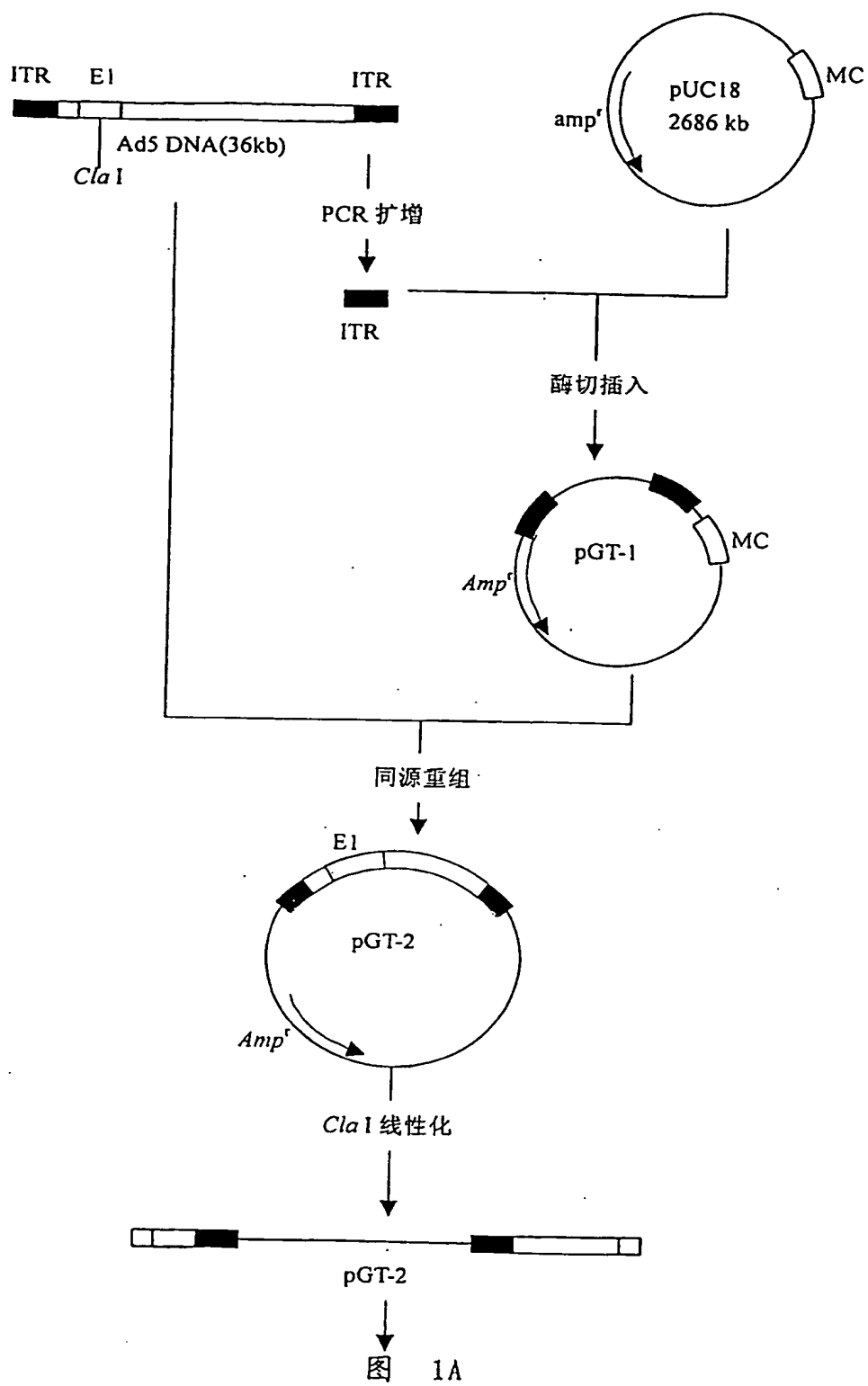
5. 根据权利要求 4 中所述的应用,其特征在於所述的原核细胞是大肠杆菌。

6. 根据权利要求 1 中所述的应用,其特征在於所述的增生性疾病是各种类型的瘢痕。

7. 根据权利要求 5 中所述的应用,其特征在於所述的瘢痕是病理性瘢痕。

8. 根据权利要求 6 中所述的应用,其特征在於所述的病理性瘢痕是瘢痕疙瘩。

9. 根据权利要求 1 中所述的应用,其特征在於所述的重组体可制成医用注射液。



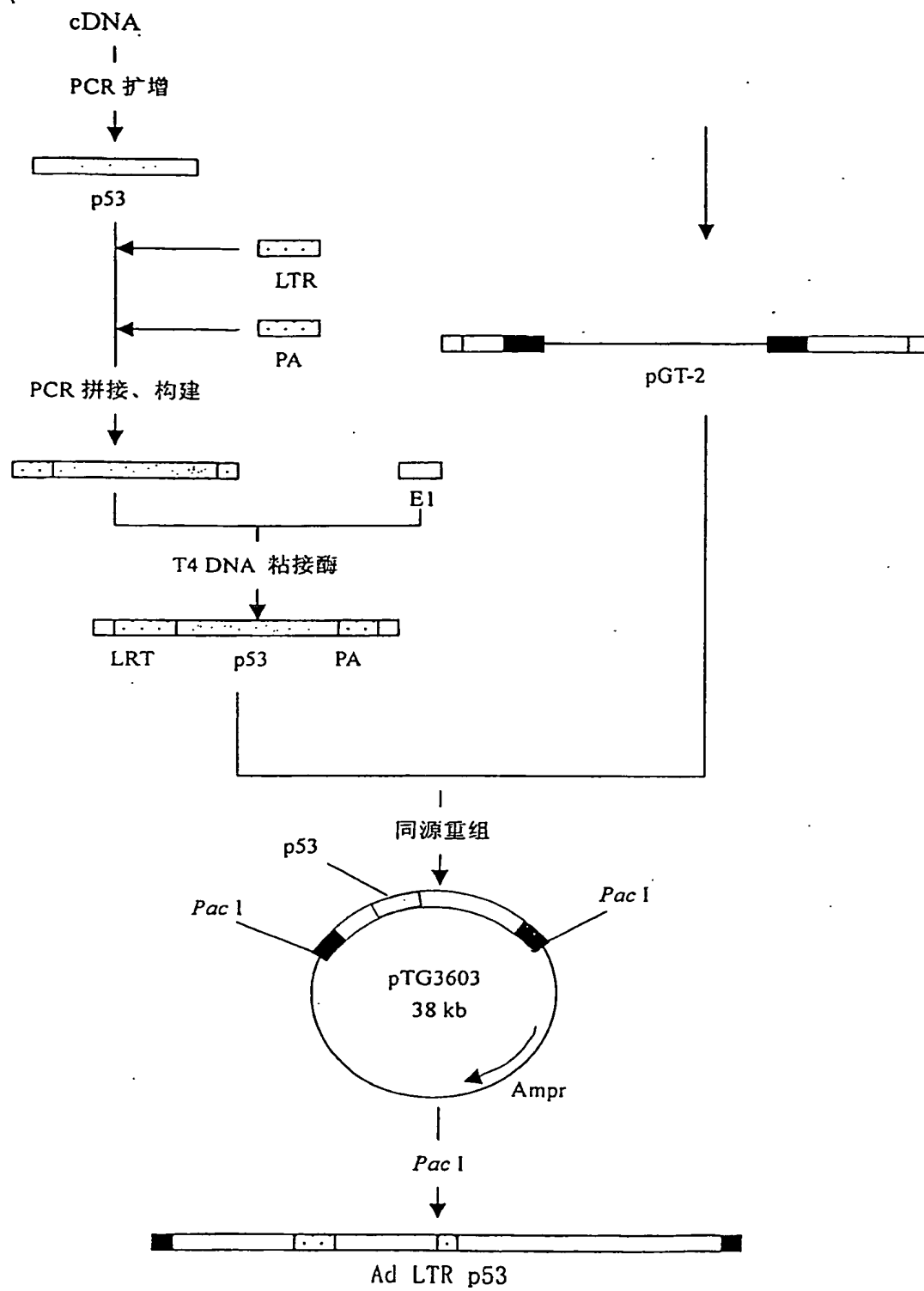


图 1B

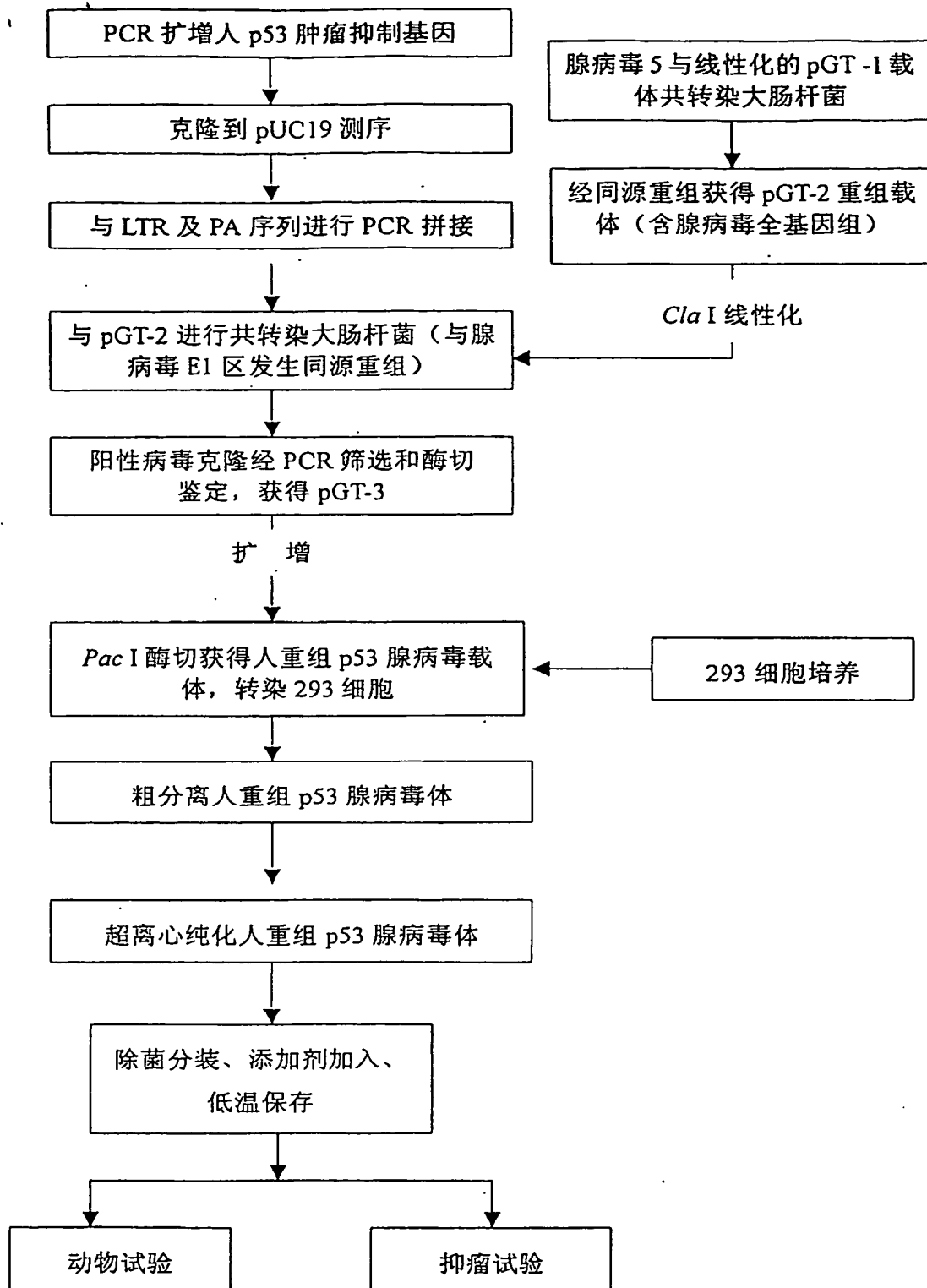


图 2

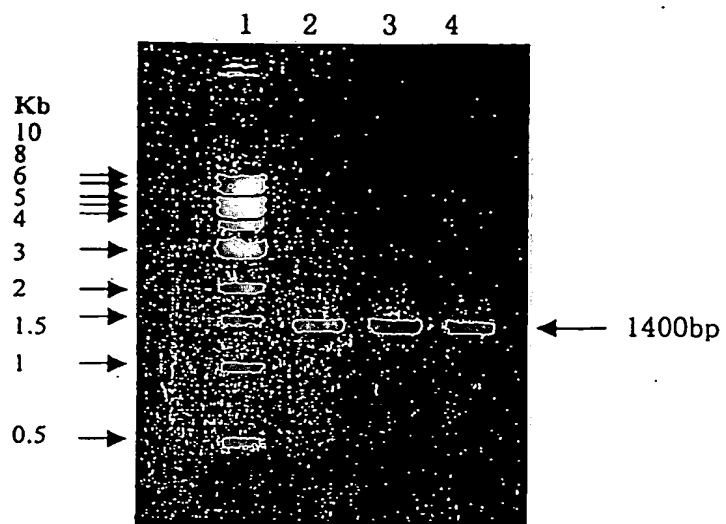


图 3

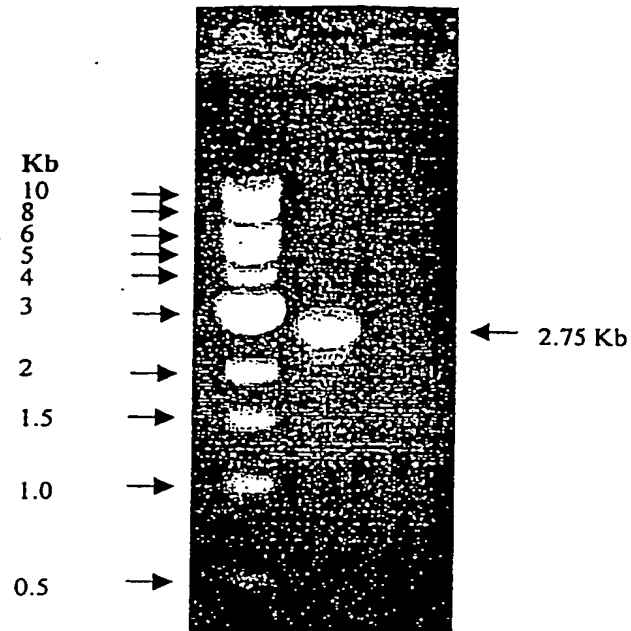


图 4

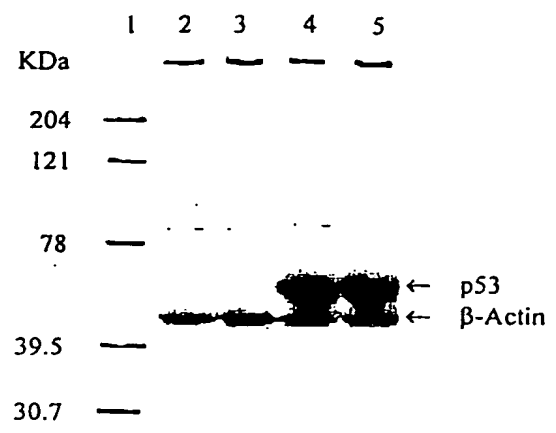


图 5



图 6

7/11

修改页 IPEA/CN

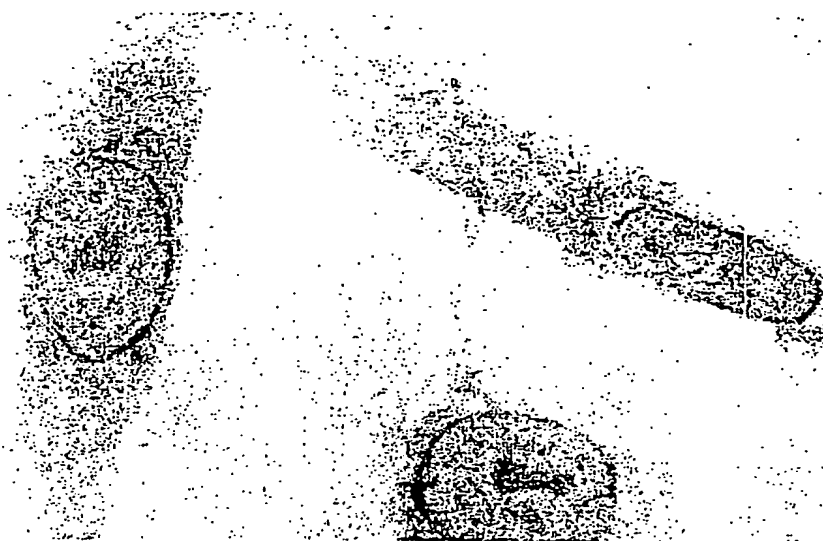


图 7

8/11

修改页 HCA/C.

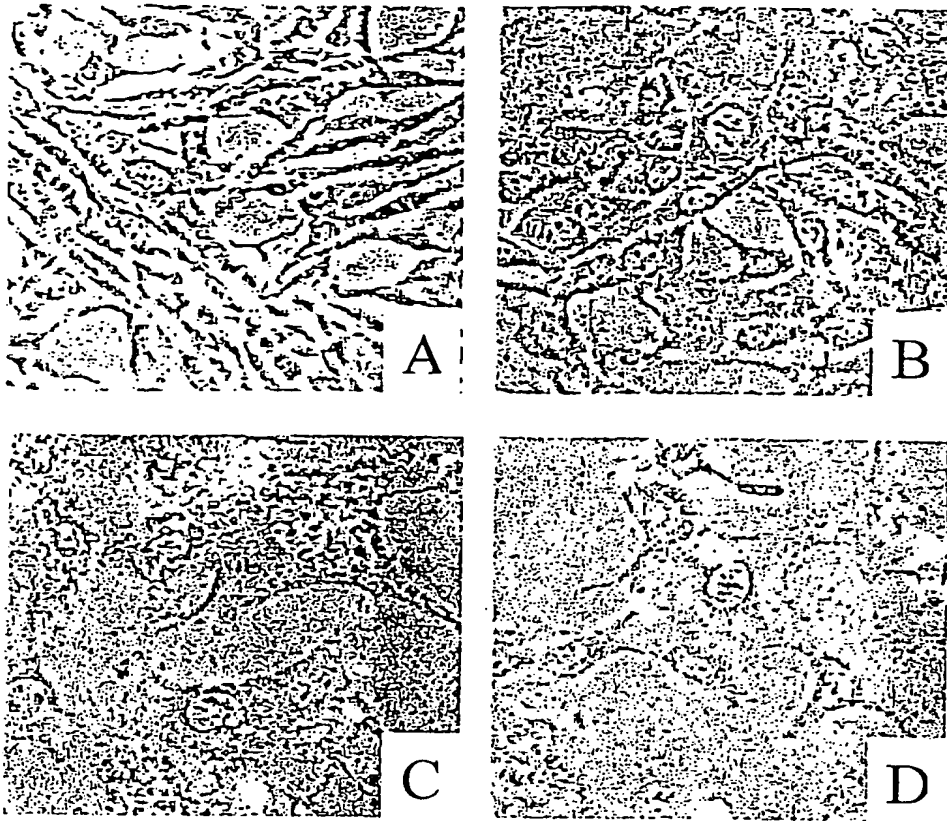


图 8

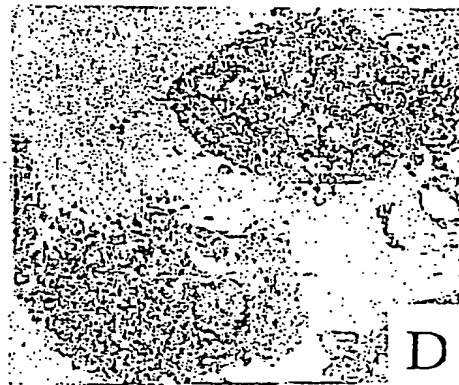
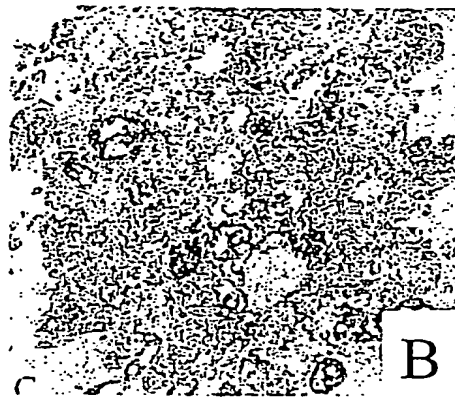


图 9

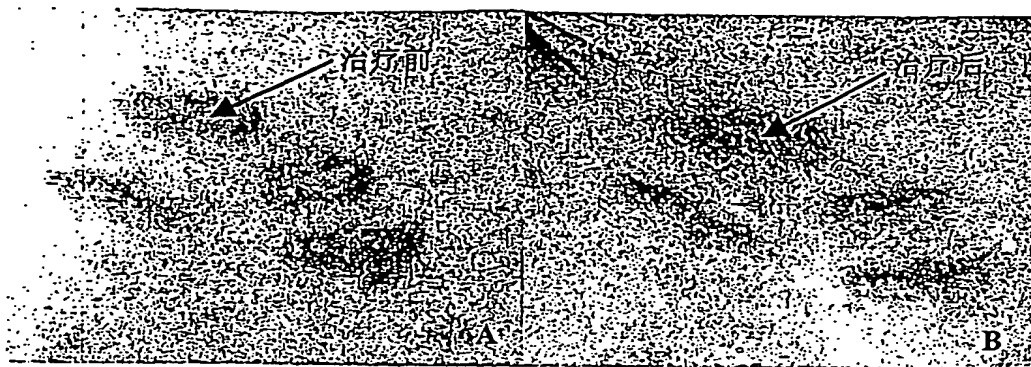


图 10



序列表

<110> 彭朝晖 等

<120> 治疗增生性疾病的腺病毒载体与 p53 基因的基因重组药物

<130> CPS41234

<140> PCT/CN2004/000458

<141> 2004-05-09

<150> CN03125129.3

<151> 2003-05-10

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2848

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

atgtttaccg ccacactcgc agggctctgca cctgggtgcgg gtctcatcgt acctcagcac	60
cttccagatc tctgacatgc gatgtcgact cgactgcttc gcgatgtacg ggccagatat	120
acgcgtatct gaggggacta ggggtgtgtt aggcgaaaag cggggcttcg gttgtacgcg	180
gttaggagtc ccctcaggat atagtagttt cgcttttgca tagggagggg gaaatgtagt	240
cttatgcaat actctttag tagttgcaaca tggtaacgat gagttagcaa catgccttac	300
aaggagagaa aaagcaccgt gcatgccgat tgggtggaagt aaggtggtac gatcgtgcct	360
tattaggaag gcaacagacg ggtctgacat ggattggacg aaccactgaa ttccgcattg	420
cagagatatt gtatttaagt gcctagctcg atacaataaa cgccatttga ccattcacca	480

cattggtgtg cacctccaag ctgtgtaccg agcteggatc ccgctagagc caccgtccag 540
ggagcaggta gctgctgggc tccggggaca ctttgcgttc gggctgggag cgtctttcca 600
cgacgggtgac acgcttcctt ggattggcag ccagactgct ttccgggtca ctgcatgga 660
ggagccgcag tcagatccta gcgtcgagcc cctctgagt caggaaacat ttccagacct 720
atggaaacta cttctgaaa acaacgttct gtcccccttg ccgtcccaag caatggatga 780
tttgatgctg tccccggagc atattgaaca atggttcact gaagaccag gtccagatga 840
agctcccaga atgccagagg ctgctcccc cgtggcccct gcaccagcag ctctacacc 900
ggcggccccct gcaccagccc cctcttgcc cctgtcatct tctgtccctt cccagaaaac 960
ctaccagggc agctacggtt tccgtctggg cttcttgcct tctgggacag ccaagtctgt 1020
gacttgacag tactcccctg cctcaacaa gatgttttgc caactggcca agacctgcc 1080
tgtgcagctg tgggttgatt ccacaccccc gcccggcacc cgcgtccgcg ccatggccat 1140
ctacaagcag tcacagcaca tgacggaggt tgtgaggcgc tgccccacc atgagcgctg 1200
ctcagatagc gatggtctgg cccctcctca gcatcttctc cgagtgaag gaaatttgcg 1260
tgtggagtat ttggatgaca gaaacacttt tcgacatagt gtggtggtgc cctatgagcc 1320
gcctgagggt ggctctgact gtaccacat cactacaac tacatgtgta acagttcctg 1380
catgggcggc atgaaccgga ggccatcct caccatcatc aactggaag actccagtgg 1440
taatctactg ggacggaaca gctttgaggt gcgtgtttgt gcctgtctg ggagagaccg 1500
gcgcacagag gaagagaatc tccgcaagaa aggggagcct caccacgagc tgccccagg 1560
gagcactaag cgagcactgc ccaacaacac cagctcctct cccagccaa agaagaaacc 1620
actggatgga gaatatttca ccttcagat ccgtgggcgt gagcgcttcg agatgttccg 1680
agagctgaat gaggccttgg aactcaagga tgcccaggct gggaaggagc caggggggag 1740
cagggtcac tccagccacc tgaagtcaa aaagggtcag tctacctccc gccataaaaa 1800

actcatgttc aagacagaag ggcctgactc agactgacat tctccacttc ttgttcccca 1860
 ctgacagcct cccaccccca tctctccctc ccctgccatt ttgggttttg ggtctttgaa 1920
 cccttgcttg caataggtgt gcgtcagaag caccaggac ttccatttgc tttgtcccgg 1980
 ggctccactg aacaagttgg cctgcaactg tgtttgttg tggggaggag gatggggagt 2040
 aggacatacc agcttagatt ttaagtttt tactgtgagg gatgtttggg agatgtaaga 2100
 aatgttcttg cagttaaggg ttagtttaca atcagccaca ttctaggtag gggccacttc 2160
 accgtactaa ccagggaagc tgtccctcac tgttgaattt tctctaactt caaggcccat 2220
 atctgtgaaa tgctggattt gccctacctc ggaatgctgg catttgcacc tacctcacag 2280
 agtgcaattgt gagggttaat gaaataatgt acatctggcc ttgaaaccac cttttattac 2340
 atggggctta gcgggatcca ctagtaacgc gccagtggtg ctggaattct gcagatatcc 2400
 atcacactgg cggccgctcg agcatgcac tagagctcg tgatcagcct cgactgtgcc 2460
 ttctagtgc cagccatctg ttgtttgcc cccccctg ctttcctga ccctggaagg 2520
 tgccactccc actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt gcatcgatt gtctgagtag 2580
 gtgtcattct attctggggg gtgggtggg gcaggacagc aagggggagg attggaaga 2640
 caatagcagg catgctgggg atgcgtggg ctctatggct tctgaggcgg aaagaaccag 2700
 ctggggctcg aggggatcc ccacgctaga gctgactata ataataaaac gccaaacttg 2760
 acccggaacg cggaaaacac ctgagaaaaa cacctgggag agtctccacg taaacggtca 2820
 aagtccccgc ggccctagac aaatatta 2846